

ZUR ISOLIERUNG VON RIBONUKLEINSÄURE AUS DEM KALBSHERZEN
UND ÜBER DIE BINDUNG VON HERZGLYKOSIDEN AN DIESE
KARDIALE RIBONUKLEINSÄURE

vorgelegt von

JÜRGEN FRANKE

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554401_0072

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

ZUR ISOLIERUNG VON RIBONUKLEINSÄURE AUS DEM KALBSHERZEN
UND ÜBER DIE BINDUNG VON HERZGLYKOSIDEN AN DIESE
KARDIALE RIBONUKLEINSÄURE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

JÜRGEN FRANKE

aus Berlin

M a i n z 1971



Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. U. Wollert

Korreferent: Prof. Dr. G. Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2.1972



gesamtherstellung
ditters bürodienst
mainz



Meiner Mutter in Dankbarkeit für ihre
Geduld und Großzügigkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
2 Methodik	3
21 Isolierung der Ribonukleinsäure	3
211 Verwendetes Gewebe	3
212 Aufarbeitung des Gewebes	3
213 Extraktion der Ribonukleinsäure	4
2131 aus Gewebe	4
2132 aus der ribosomalen Fraktion	6
22 Quantitative Bestimmung der Ribonukleinsäure	7
221 in biologischem Material	7
222 in Lösungen	8
23 Reinheitsprüfung und Charakterisierung der Ribonukleinsäure	8
231 Bestimmung von Ribonukleinsäure	8
232 Bestimmung des Phosphorgehaltes	8
233 Bestimmung von Desoxyribonukleinsäure	8
234 Bestimmung von Protein	8
235 Bestimmung der Svedberg-Konstante	9
24 Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden mit kardialer Ribonukleinsäure mittels Ultrazentrifugation	9
25 Statistische Methoden	12
26 Verwendete Lösungen und Substanzen	12
3 Ergebnisse	15
31 Ausbeute der Isolierung von Ribonukleinsäure	15
311 aus Gewebe	15
312 aus der ribosomalen Fraktion	15
32 Ribonukleinsäure in Homogenat und Überständen	17

33 Reinheitsprüfung und Charakterisierung der isolierten Ribonukleinsäure	18
331 Ergebnis der Ribonukleinsäure- Bestimmung	18
332 Ergebnis der Phosphor-Bestimmung	18
333 Ergebnis der Desoxyribonukleinsäure- Bestimmung	19
334 Ergebnis der Protein-Bestimmung	19
335 Ergebnis der Bestimmung der Svedberg- Konstante	19
34 Die Wechselwirkung von Herzglykosiden mit kardialer Ribonukleinsäure	20
4 Diskussion	21
41 der Methodik	21
411 Zur Isolierung und Bestimmung der Ribonukleinsäure	21
412 Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden und kardialer Ribonukleinsäure	23
42 der Ergebnisse	24
421 Die isolierte Ribonukleinsäure	24
422 Die Bindung der Herzglykoside an kardiale Ribonukleinsäure	25
5 Zusammenfassung	27
6 Literatur	29
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Einige herzoglykosidartig wirkende Bisguanylhydrazone haben eine sehr lange Verweildauer im Meerschweinchenherzen (Hofmann u. Wollert, 1969 a,b). Die Untersuchung der subcellulären Verteilung dieser Substanzen im Herzmuskel ergab, daß sie in der mikrosomalen Fraktion angereichert werden (Hofmann u. Wollert, 1969 c), und daß sie aus dieser Fraktion nicht auswaschbar sind (Wollert et al., 1968).

Die Verweildauer von Herzglykosiden im Herzen ist sehr viel geringer (Repke, 1958; Harrison et al., 1966) aber auch für sie konnte eine Anreicherung in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels nachgewiesen werden (Dutta et al., 1968; Gerber et al., 1968). Im Gegensatz zu den Bisguanylhydrazonen sind die Glykoside aber aus der mikrosomalen Fraktion auswaschbar (Dutta et al., 1967). Da die Anreicherung in der mikrosomalen Fraktion für die Wirkung von Bedeutung sein könnte (Dutta et al., 1968; Gerber et al., 1968; Chipperfield u. Nayler, 1969) war nun die Frage interessant, an welchen Bestandteil der mikrosomalen Fraktion die herzwirksamen Substanzen gebunden werden. Die starke Bindung einiger Herzglykoside in therapeutischer Konzentration an Serumalbumin wurde nachgewiesen (Kuschinsky, 1969). Für die Bisguanylhydrazone wurde eine sehr starke Bindung an Hefe-Ribonukleinsäure (im folgenden als RNA

abgekürzt) festgestellt (Riechert u. Wollert, 1971). Damit war es sehr wahrscheinlich geworden, daß bei der Anreicherung der Bisguanylhydrazone in der mikrosomalen Fraktion des Herzens der RNA eine wichtige Rolle zukommt.

Zu prüfen war nun, ob auch für die Anreicherung der Herzglykoside in der mikrosomalen Fraktion von Säugetierherzen RNA von Bedeutung ist. Die vorliegende Arbeit versucht diese Frage zu klären. Zu diesem Zweck erschien es sinnvoll, ribosomale Ribonukleinsäure aus einem Säugetierherzen und nicht wie bei bisherigen Versuchen Hefe-RNA zu verwenden (Scholtan, 1968; Riechert u. Wollert, 1971; Kemp u. Woodbury, 1971). Dazu mußte zuerst eine Methode gefunden werden, mit der RNA aus dem Herzen in genügender Menge und Reinheit gewonnen werden kann. Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden und RNA galt es, eine Methode zu finden, die es erlaubt mit der zu erwartenden geringen Menge RNA eine ausreichende Anzahl von Versuchen zu machen.

2. METHODIK

21 Isolierung der Ribonukleinsäure

211 Verwendetes Gewebe

Die RNA wurde aus Kalbsherzen isoliert. Das Kalbsherz wurde in 0,9%iger Natriumchloridlösung, die eine Temperatur von -1°C hatte, in einem Dewar Gefäß vom Schlachthof antransportiert. Anschließend wurden in der Kühlkammer (-1°C) Fett- und Bindegewebe grob abpräpariert. Danach wurden Muskelstücke zu ca. 50 g hergestellt, die in der Tiefkühltruhe (-16°C) 1-3 Tage gelagert wurden. Diese Gewebsstücke wurden vor Versuchsbeginn - soweit makroskopisch sichtbar - von dem verbliebenen Bindegewebe (Peri- und Endokard; größere Gefäße) befreit und in Stücken zu je 5 g abgewogen.

212 Aufarbeitung des Gewebes

Homogenisation: Es wurden unter Eiskühlung 10%ige Homogenate hergestellt (5 g Muskel und 45 ml Lösung) in 0,9%iger Natriumchloridlösung, in 0,25 M Saccharoselösung pH 7,4 in Lösung A (s. 26) und in Lösung B (s. 26).

Zunächst wurde mit einem Ultra-Turrax 10 Sekunden schwach zur Zerkleinerung des Gewebes und dann 20 Sekunden stark homogenisiert. Anschließend wurden 15-16 ml dieses Homogenates mit einem maschinell angetriebenen Zellhomogenisator (Fa. Colora, Lorch) in einem 50 ml

Glasgefäß mit Teflonpistill 10 Sekunden, während denen sich das Pistill 3 mal auf- und abbewegte, weiter homogenisiert.

Die RNA wurde entweder direkt aus dem Homogenat oder aus der ribosomalen Fraktion extrahiert.

Zentrifugation zur Gewinnung der ribosomalen Fraktion:

Das Homogenat wurde in der Sorvall RC2-B Zentrifuge bei 5000 x g (Rotor HS 4; 5100 UpM) 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in der Beckman Spinco L2 - 65B Ultrazentrifuge bei 176 600 x g (60 Ti Festwinkelrotor; 50 000 UpM) 145 Minuten zentrifugiert (Earl u. Korner, 1965).

Die im folgenden Text als ribosomale Fraktion bezeichneten Sedimente wurden gesammelt und bis zur Extraktion der RNA bei -5°C aufbewahrt.

213 Extraktion der Ribonukleinsäure

2131 aus Gewebe: Sie erfolgte im Prinzip nach der Vorschrift von Kirby (1965). Je 40 g Gewebe wurden mit Lösung A oder Lösung B homogenisiert, mit dem gleichen Volumen Phenol/m-Kresol-Mischung (s. Punkt 26) versetzt und dann 20 Minuten langsam bei Zimmertemperatur geschüttelt (90 UpM auf der Schüttelmaschine der Fa. E. Bühler, Tübingen). Nach dem Schütteln wurde in der Sorvall RC2 - B Zentrifuge bei 6000 x g (Rotor HS 4; 5600 UpM) 20 Minuten bei 2°C zentrifugiert und anschließend der wässrige

Überstand abgesaugt. Zu je 100 ml Überstand wurden 3 g Natriumchlorid und 4 g Tri-iso-propylnaphthalinsulfonat und 50 ml Phenol/m-Kresol-Mischung hinzugefügt und das Gemisch wurde wieder wie oben beschrieben geschüttelt. Anschließend wurde es bei 8000 x g (Sorvall RC2 - 8; Rotor HS 4; 6500 UpM) 10 Minuten zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgesaugt und die letzte Zentrifugation, nach Zugabe von soviel wäßriger Lösung wie in der Phenolphase verblieben war, wiederholt. Nach abziehen der wäßrigen Phase, die zu dem vorher gewonnenen Überstand gegeben wurde, wurde soviel Natriumchlorid zugesetzt, daß der Überstand insgesamt 4% Natriumchlorid enthielt. Zu den vereinigten Überständen wurden pro 100 ml 20 g Natriumbenzoat, 10 ml m-Kresol und 200 ml Äthanol hinzugefügt und die Lösung zum Ausfällen der RNA über Nacht in der Tiefkühltruhe (-16°C) aufbewahrt. Das Ausfällen gelingt auch, wenn man die Lösung ohne Alkohol über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Der ausgefallene Niederschlag wurde aufgewirbelt und bei 750 x g (Sorvall RC2-8; Rotor HS 4; 2000 UpM) in 10 Minuten sedimentiert und mittels der 1. Waschlösung (s. Waschen) in kleinere (50 ml) Zentrifugenbecher überführt.

Waschen: Waschlösungen (in der Reihenfolge der Anwendung:

a, b, c ... usw.)

a) 100 ml Aqua dest., 20 g Natriumbenzoat, 10 ml m-Kresol,
3 g Natriumchlorid

- b) 50% Äthanol, 2% Natriumchlorid
- c) 75% Äthanol, 1% Natriumchlorid
- d) 75% Äthanol
- e) und
- f) 100% Äthanol
- g) Äther

Es wurde jeweils bei 2500 x g (Sorvall RC2 - B; Rotor HB 4; 4000 UpM) 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment in 25-30 ml der nächsten Waschlösung mit einem Glasstab aufgewirbelt. Nach dem Waschen wurde die Substanz mit Äther in eine Abdampfschale überführt und im Vakuum getrocknet.

2132 Extraktion aus der ribosomalen Fraktion: Sie erfolgte nach demselben Verfahren wie es oben angegeben ist. Die gesammelten Sedimente (s. oben: Zentrifugation) wurden mit dem Ultra-Turrax in Lösung B homogenisiert. Im Unterschied zu dem oben angegebenen Verfahren wurde aber bei dem ersten Schritt der Phenolextraktion nicht das gleiche, sondern nur das halbe Volumen Phenol-Kresol-Mischung, dem Homogenat zugesetzt. Diese Methodik wurde angewendet, um die für die Bindungsversuche notwendige Menge RNA zu isolieren.

22 Quantitative Bestimmung der Ribonukleinsäure

Die RNA wurde mit der Orcin Reaktion in der Modifikation von I-San Lin und O.A. Schjeide (1969) bestimmt.

221 Ribonukleinsäure-Bestimmung aus biologischem

Material

Vom Homogenat und den Überständen wurden je 2 ml mit dem gleichen Volumen 10%iger Trichloressigsäure (TCE) versetzt und bei 12 500 x g (Sorvall RC2 - B; Rotor SM-24; 10 000 UpM) 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde 4 mal mit 5%iger TCE gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Zuletzt wurde das Sediment mit 5 ml 5%iger TCE versetzt und in einem Wasserbad von 90°C 20 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde die Suspension bei 12 500 x g 10 Minuten zentrifugiert. In dem Überstand erfolgte dann die RNA-Bestimmung (Mulé et al., 1967):

- Leerwert: 1 ml 5%ige TCE, 1 ml Tris/HCl-Puffer pH 7,4;
2 ml Orcin Reagenz
- Eichwerte: 1 ml 5%ige TCE, 0,01 - 0,10 ml Standardlösung
(s. Punkt 26), 0,98 - 0,90 ml Tris/HCl-Puffer
pH 7,4, 2 ml Orcin Reagenz
- Proben: 1 ml TCE-Überstand, 1 ml Tris/HCl-Puffer
pH 7,4, 2 ml Orcin Reagenz

222 Ribonukleinsäure-Bestimmung in Lösungen

Die bei der Extraktion gewonnene Substanz wurde wie der Standard (Hefe-RNA) in Tris-Puffer pH 7,4 in einer Konzentration von 0,5 mg oder 1,0 mg/ml gelöst. Je 0,1 und 0,2 ml oder 0,05 und 0,10 ml der Lösungen wurden, wie unter 221 angeführt (Eichwerte) 4 fach bestimmt.

23 Reinheitsprüfung und Charakterisierung der

Ribonukleinsäure

Nach Abschluß der Versuche wurden die aus gleichartigen Experimenten gewonnenen Extrakte zusammengegeben, noch einmal dem Waschvorgang unterzogen und getrocknet. Die Reinheitsprüfung erfolgte im Vergleich zu Hefe-RNA als Standard.

231 Die Bestimmung der RNA erfolgte wie unter 222 angeführt.

232 Die Bestimmung des Phosphors erfolgte nach Allen (1940).

233 Die DNA-Bestimmung erfolgte mit der Diphenylamin Reaktion nach Burton (1956).

234 Die Bestimmung von Protein erfolgte nach Lowry et al. (1951) und nach Warburg und Christian (1941).

235 Bestimmung der Svedberg-Konstante⁽¹⁾

Die Svedberg-Konstante wurde mittels Schlierenzentrifugation bestimmt.

Zusätzlich wurden Dialyseversuche (Riechert u. Wollert, 1971) mit 0,05%iger Lösung der isolierten RNA im Vergleich zu Hefe-RNA, um den Anteil kleinerer Bruchstücke herauszufinden. 4 ml einer Lösung wurden in Visking-Dialysierschläuchen (Fa. Serva, Nr. 44104, 15-20 Å) gefüllt und die einzelnen Säckchen von 7 mm Breite in Glasröhren von 8 mm lichter Weite, die 4 ml 0,2 M Tris-HCl Pufferlösung pH 7,4 (in der auch die RNA gelöst wurde) enthielten, maschinell auf- und abbewegt (16 Std. Zimmertemperatur). Danach wurde die RNA-Konzentration in den Dialysiersäckchen und in der Pufferlösung bestimmt.

24. Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden mit kardialer Ribonukleinsäure mittels Ultrazentrifugation

Lösungen: Verwendet wurde eine mit der isolierten RNA hergestellte 0,5%ige Lösung. Je 50 mg isolierte RNA wurde in 10 ml Tris/HCl-Puffer pH 7,4 gelöst. Dann wurde

(1) Für die Bestimmung der Svedberg-Konstante mittels der Schlieren-Zentrifugation möchte ich Herrn Dr. Strohmaier von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (Tübingen) sehr herzlich danken.

die Lösung 2 mal filtriert, um Verunreinigungen zu entfernen. Eine anschließende Kontrolle zeigte, daß der RNA-Gehalt nicht beeinträchtigt war. Zuletzt wurden die Herzglykoside - Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin so hinzugefügt, daß die Lösungen jeweils 3×10^{-7} bzw. 3×10^{-6} g Herzglykosid/ml enthielten. In jedem Ansatz war ein Teil der zugegebenen Menge Herzglykosid ^3H markiert. Zu je 10 ml RNA-Lösung wurden 5 μl der markierten Ausgangslösungen gegeben. Die markierten Ausgangslösungen waren wie folgt charakterisiert:

	Konzentration (mg/ml)	spezifische Aktivität (curies/mM)
Digitoxin- H^3 (G)	0,170	4,5
Digoxin- H^3 (G)	0,065	12,0
Ouabain- H^3 (G)	0,050	11,7

Die Reinheit der Präparate wurde mit dem Radiochromatogram Scanner (Fa. Packard, Modell 7201) kontrolliert.

Zentrifugation: Die Lösungen wurden in Röhrchen, die 2 ml fassen, gefüllt. Von jeder Konzentration wurden pro Herzglykosid mindestens 3 Proben zentrifugiert. Zur Zentrifugation wurde die Ultrazentrifuge Spinco L2 65B (Fa. Beckman) und der Rotor Typ 65 (Festwinkelrotor) verwendet. Um die kleinen Röhrchen zentrifugieren zu können, wurden Adapter (Fa. Beckman, Nr. 303376) eingesetzt.

Die Zentrifugationsbedingungen waren: 50.000 UpM (159.000 x g), 16 Stunden, 20°C.

Erstellen der Proben und Messung der Aktivität: Nach der Zentrifugation wurde der Verschluß der Röhrchen entfernt und diese 30 Sekunden in flüssige Luft getaucht. Anschließend wurde das 49 mm lange Röhrchen mit einer Kreissäge wie folgt zersägt: zuerst wurde die oberste Schicht (4 mm) abgesägt und verworfen; dann wurde ein 25 mm langes Röhrchenstück abgesägt, dessen Inhalt dem Zentrifugationsüberstand entspricht, in dem die Radioaktivität gemessen werden sollte. Der Rest, der die sedimentierte RNA enthielt, wurde verworfen. Nach dem Auftauen des Überstandes wurden zwei Proben zu 0,2 ml entnommen, in ein Glasgefäß gefüllt und 10 ml Szintillationslösung Insta-Gel (Fa. Packard) hinzugefügt. Die Messung der Radioaktivität (dpm) erfolgte mit dem Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer (Fa. Packard, Modell 3380 mit Automatik Modell 544).

Gemessen wurde jeweils die nicht zentrifugierte RNA/Herzglykosid-Lösung (=100%) im Vergleich zu dem entsprechenden Ultrazentrifugationsüberstand. Dabei wurde die nicht zentrifugierte Lösung genauso behandelt wie die zentrifugierte, d.h. sie wurde vor der Messung eingefroren, zersägt und wieder aufgetaut.

Charakterisierung der Wechselwirkung der Glykoside

mit RNA: Die Wechselwirkung der Glykoside mit der kardialen RNA wurde durch den prozentualen Anteil (Scholtan et al., 1966) an freier Substanz (α) charakterisiert.

25 Statistische Methoden

Von den Ergebnissen mehrerer ($n = 3$) Versuche wurde der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) errechnet (Snedecor, 1950). Die Ergebnisse der Bindungsversuche wurden nach dem Wilcoxon-Test (Koller, 1969) kontrolliert.

26 Lösungen und Substanzen

Lösung A: (Kirby, 1965)

0,5%ige Dinatriumnaphthalin-1,5-disulfonat-
lösung

Lösung B: (Parish u. Kirby, 1966)

1 g Tri-iso-propylnaphthalinsulfonat Natrium-
salz

6 ml Butanol-(2)

100 ml Aqua dest.

6 g 4-Amino-salicylsäure Natriumsalz (PAS)

1 g Natriumchlorid

Phenol/m-Kresol Mischung:

100 g frisch über Zinkstaub destilliertes Phenol

14 g farbloses m-Kresol

11 g Aqua dest.

0,1 g 8-Hydroxychinolin

Hefe-RNA-Standardlösung:

10 mg Hefe-RNA in 2,5 ml 0,2 M Tris

2,07 ml 0,2 N HCl

ad 10,0 ml Aqua dest. (Tris/HCl-Puffer
pH 7,4)

Die nicht besonders gekennzeichneten Substanzen wurden
von der Fa. Merck, Darmstadt geliefert.

Acetaldehyd zur Synthese

4-Amino-salicylsäure Natriumsalz Schuchardt, München

Ammoniumheptamolybdat p.a.

Äthanol absolut p.a.

Butanol-(2) p.a.

2-Desoxy-D-ribose

Diäthyläther

Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin, Boehringer Mannheim

³H-Digitoxin, ³H-Digoxin und ³H-Ouabain, New England
Nuclear Chemicals, Dreieichenhain

Diphenylamin p.a.

Essigsäure, min. 96% p.a.

4-Hydroxy-m-phenylen-diammonium-dichlorid krist.

8-Hydroxychinolin p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

m-Kresol zur Synthese

Kupfer(II)-chlorid p.a.

Naphthalin-1,5,-Disulfonsäure Dinatriumsalz, Fluka,
Karlsruhe

Natriumchlorid p.a.

Natriumbenzoat gepulvert DAB 6

Natriumpyrosulfit trocken p.a.

Norit A pract. Serva, Heidelberg

Orcin krist.

Perchlorsäure etwa 70% p.a.

Phenol p.a.

Ribonukleinsäure (Hefe) Boehringer, Mannheim

Salzsäure rauchend min. 37% p.a.

Schwefelsäure 95-97% p.a.

Trichloressigsäure p.a.

Tri-iso-propylnaphthalensulfonic Acid sodium salt
Eastman Organic Chemicals, New York

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan p.a.

3. ERGEBNISSE

31 Ausbeute der Isolierung von Ribonukleinsäure

311 aus Gewebe

Bei der Extraktion mit Lösung A (s. 26) wurden 14 mg/
100 g Feuchtgewicht Herz gewonnen.

mg Ausbeute		
	aus 40 g	pro 100 g FG
	3,9	9,8
	2,5	6,8
	4,0	10,0
	11,0	27,5
	6,6	16,5
Mittelwert	5,60 $\pm$ 1,50	14,12 $\pm$ 3,70

Bei der Extraktion mit Lösung B (s. 26) wurden in einem Versuch aus 40 g Herzgewebe 223 mg Substanz gewonnen, die aber weniger als 10% RNA enthielt. Sowohl bei diesem, als auch bei einem weiteren Versuch war aber der DNA-Anteil so groß, daß von weiteren Versuchen dieser Art abgesehen wurde.

312 Ausbeute der Isolierung von Ribonukleinsäure aus der ribosomalen Fraktion

Bei der Extraktion aus der ribosomalen Fraktion wurden 62,4% der in den Ribosomen bestimmten RNA gewonnen; auf das Feuchtgewicht bezogen sind das 23,5 $\pm$ 1,8 mg/100 g FG.

eingesetzte Menge ($\ddot{U}_1$) in ml	mg Ausbeute		
	insgesamt	pro 100 g (1)	FG* (2)
87o	40,4	30,6	41,8
261o	74,2	18,7	25,6
145o	57,5	26,1	39,3
203o	91,0	29,6	40,3
232o	77,0	21,9	29,9
261o	111,2	28,1	38,3
232o	64,3	18,3	24,9
232o	56,2**	16,0	21,8
203o	69,0**	22,4	30,6
	Mittelwert	23,52 $\pm$ 1,77	32,50 $\pm$ 2,52

($\ddot{U}_1$) Der aus dem Homogenat nach Zentrifugation bei 5000 x g/10 min gewonnene Überstand (s. 212: Zentrifugation).

* Die Berechnung pro 100 g Feuchtgewicht (FG) erfolgte, um eine praktische Bezugsgröße und einen Vergleichswert für die Extraktion von RNA aus dem Gewebe zu erhalten. Bei der Gewinnung des Überstandes ($\ddot{U}_1$) werden nur 73% von der für die Herstellung des Homogenats eingesetzte Flüssigkeitsmenge zurückgewonnen. Ein Teil der Flüssigkeit wird im Gewebe zurückgehalten, ein Teil wurde verworfen, da er Schlieren vom Sediment enthielt. Es wurden von einem Homogenat aus 100 g Gewebe und 900 ml Lösung B 660 ml Überstand ($\ddot{U}_1$) gewonnen. Die Zahlen in Spalte (1) geben an, welche Ausbeute in jedem Versuch tatsächlich pro 100 g verarbeitetes Gewebe erreicht wurde.

Will man aber errechnen, welcher Anteil der im Homogenat bestimmten Menge RNA in den Überstand gelangt und aus diesem extrahiert wird, muß die gesamte eingesetzte Flüssigkeitsmenge berücksichtigt werden, also 900 ml/100 g Gewebe. So sind die Werte der Spalte (2) errechnet.

** In diesen Versuchen erfolgte die Ausfällung ohne Äthanol.

32 Ribonukleinsäure in Homogenat und Überständen

Für die Gewinnung der RNA aus der ribosomalen Fraktion ist für die Quantität das für die Herstellung des Homogenats verwendete Lösungsmittel von entscheidender Bedeutung:

Homogenat und Überstand in	RNA im Überstand in % der im Homogenat bestimmten RNA
0,9%iger NaCl-Lsg.	(9,1)
0,25 M Saccharoselsg. pH 7,4	(13,6)
Lösung A (s. 25 ⁶ / ₆)	(26,7)
Lösung B (s. 25 ₆)	(70,3)

(n = 2)

Da aus dem Überstand ($\bar{U}_1$) die Ribosomen sedimentiert werden, ist klar, daß eine Extraktion von RNA aus dem Sediment nur dann ausreichend Erfolg haben kann, wenn sich in dem Überstand genügend RNA befindet. Das ist nur bei Lösung B der Fall.

Dazu kommt, daß nach der Ultrazentrifugation die Sedimente, die aus Überstand in Lösung B gewonnen werden pro Gewichtseinheit mehr als doppelt soviel RNA enthalten wie Sedimente, die aus Überständen in 0,24 M Saccharoselösung pH 7,4 gewonnen werden (n = 2).

Der RNA-Gehalt in Homogenat und Überständen, wobei das Homogenat in Lösung B angesetzt ist: $\mu\text{g RNA/ml}$

Homogenat	Überstand nach 5000xg/10 Min.	Überstand nach 176000xg/145 Min.
152,5	130,0	53,0
196,3	143,0	71,8
196,3	140,5	60,0
191,8	125,0	53,8
191,8	166,7	77,5
162,5	140,0	61,3
161,3	128,0	45,8
187,5	126,5	58,8
171,3	137,5	66,5
178,8	140,0	48,8
Mittelwert	179,01 $\pm$ 5,11	137,72 $\pm$ 3,84
		59,73 $\pm$ 3,17

Aus den Werten für das Homogenat errechnet sich ein RNA-Gehalt von 1,79 mg RNA/g FG Herz (n = 15).

33 Reinheitsprüfung und Charakterisierung der isolierten Ribonukleinsäure

331 Ergebnis der Ribonukleinsäure-Bestimmung

Der RNA-Gehalt betrug, nachdem die Proben aus den einzelnen Versuchen zusammen gegeben und noch einmal gewaschen worden waren, 85,3%.

332 Ergebnis der Phosphor-Bestimmung

Die Phosphorbestimmung ergab einen Gehalt von 7,24% gegenüber 8,24% der als Standard benutzten Hefe-RNA, das entspricht 87,9%.

333 Ergebnis der Desoxyribonukleinsäure-Bestimmung

Die Verunreinigung mit DNA beträgt 0,6%.

334 Ergebnis der Protein-Bestimmung

In Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg isoliertem Material/ml fand sich weniger Protein als in einer zum Vergleich hergestellten Hefe-RNA Lösung gleicher Konzentration, für die ein Gehalt von 4% Protein festgestellt wurde.

Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 280 und 260 nm bestimmt (Warburg und Christian, 1941). Danach war weder in der Hefe RNA ($E_{280}/E_{260} = 0,476$) noch in der isolierten RNA ($E_{280}/E_{260} = 0,489$) Protein nachweisbar.

335 Ergebnis der Bestimmung der Svedberg-Konstante

Die mittels Schlieren Zentrifugation ermittelte Svedberg-Konstante ergab, daß die Substanz nicht einheitlich war. Das Maximum wanderte mit 7,6 Svedberg. Ein zweiter Lauf mit UV-Optik ergab eine breite Übergangszone von 6,5 - 10,5 Svedberg und einem Schwerpunkt der Verteilung bei 7,5 - 8 Svedberg.

Die Dialysierversuche ergaben, daß von der Hefe-RNA mehr als 40% so kleine Bruchstücke sind, daß sie die Dialysemembran passieren, während von der isolierten RNA gar keine Bruchstücke durch die Poren (15-20 Å) der Dialysemembran treten. D.h., daß das Molekulargewicht der Bruchstücke auf jeden Fall größer als 20 000 ist.

34 Die Wechselwirkung von Herzglykosiden mit kardialer Ribonukleinsäure

Tabelle 1:

Prozentualer Anteil (α) an freiem, ungebundenem Herzglykosid;
Mittelwert aus der angegebenen Anzahl von Versuchen (n) $\pm s_{\bar{x}}$.

Konzentration (g/ml)	Herzglykosid					
	Digitoxin	n	Digoxin	n	g-Strophanthin	n
3×10^{-7}	$85,2 \pm 4,7$	4	$91,5 \pm 0,8$	3	$92,2 \pm 0,3$	3
3×10^{-6}	$86,0 \pm 3,1$	6	$93,8 \pm 1,9$	3	$91,8 \pm 0,2$	3

Der Vergleich der Mittelwerte des prozentualen Anteils (α) an freiem, ungebundenem Digitoxin und Digoxin (3×10^{-6} g/ml) wurde nach dem Wilcoxon-Rangtest durchgeführt. Er zeigt, daß auf dem 5% Niveau kein statistisch gesicherter Unterschied zwischen diesen α -Werten besteht.

Vergleiche der übrigen α -Werte nach dem Wilcoxon-Rangtest sind aufgrund der geringen Versuchszahl nicht möglich. Nach den Mittelwerten und $s_{\bar{x}}$ kann man aber annehmen, daß auch hier kein Unterschied besteht.

4. DISKUSSION

41 der Methodik

411 Zur Isolierung und Bestimmung der Ribonukleinsäure

Zunächst war zu entscheiden, ob die RNA aus Gewebe oder aus der ribosomalen Fraktion isoliert werden sollte. Kirby (1965) gibt eine Methode zur Extraktion von RNA aus Lebergewebe an. Muskelgewebe enthält 7-9 mal weniger RNA als Lebergewebe (Munro und Gray, 1969). Die zunächst aus Homogenat in 0,25 M Saccharoselösung erzielte Ausbeute von 14 mg RNA/100 g Herzmuskel (Feuchtgewicht) war im Vergleich zu dem von Kirby (1965) erreichten Wert von 60 mg RNA/14 g Leber (Feuchtgewicht) sehr niedrig. Auch eine Extraktion aus der ribosomalen Fraktion führte zu keinem besseren Resultat, weil die Ausbeute an Ribosomen sehr gering war. Erst mit der Herstellung des Homogenats in Lösung B, statt wie bis dahin in 0,25 M Saccharoselösung und der anschließenden Extraktion der RNA aus der ribosomalen Fraktion, brachte eine befriedigende Ausbeute. Eine Extraktion direkt aus dem Homogenat in Lösung B erfordert eine anschließende Trennung von RNA und DNA und erschien daher ungünstig für die alleinige Isolierung von RNA.

Eine geringfügige Modifikation im Verfahren der Isolierung (Kirby, 1965) ist die Zugabe von nur 0,5 Volumen Phenol/Kresol-Mischung zum Homogenat beim ersten Schritt

der Phenolextraktion statt 1,0 Volumen wie in der Vorschrift angegeben. Dies geschah, weil sich herausstellte, daß bei der Anwendung von 1,0 Volumen Phenol/Kresol-Mischung die Interphase (zwischen der Phenolphase und der wässrigen Phase) fast bis zur Oberfläche reichte, so daß nur eine sehr geringe Menge, der für die Extraktion der RNA benötigten wässrigen Phase abgenommen werden konnte.

Die Bestimmung der RNA in Homogenat und Überständen erfolgte in Lösung B. Der Verdacht lag nahe, daß wenn diese Lösung geeignet ist, in so großem Umfang (s. 32) RNA aus dem Gewebe in Lösung zu bringen, sie bei der RNA-Bestimmung mit ihren Waschvorgängen einen störenden Einfluß ausüben könnte. Der Vergleich von Homogenaten, die in 0,9%iger Kochsalzlösung, in 0,25 M Saccharoselösung pH 7,4 und in Lösung A und B (s. 26) angesetzt waren, konnte diesen Verdacht widerlegen. Ein Einwand gegen die quantitative Genauigkeit der Orcinmethode bei der Bestimmung von RNA in biologischem Material ist allerdings zu machen: unabhängig davon ob man das Homogenat in Kochsalzlösung, Lösung A oder B herstellt, unabhängig davon, ob man die Fällung von Eiweiß und Nukleinsäuren mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure vornimmt, findet man in jedem Fall in dem dabei entstehenden Überstand, der vor den Waschvorgängen verworfen wird (s. 221) eine Orcin-Farbreaktion, die z.T. ausgeprägter ist als die

Farbreaktion des zuletzt zur RNA-Bestimmung gewonnenen Überstandes.

Ob es sich um Bruchstücke der RNA oder um kleinmolekulare Substanzen handelt, die ebenfalls mit Orcin reagieren, ist an Hand dieser Methode nicht zu entscheiden. Die Tatsache allerdings, daß diese Reaktion sowohl bei dem Homogenat als auch bei Überstand 1 (nach 5000 x g/10 Min.) und Überstand 2 (nach 176 000/145 Min.) in gleichem Ausmaß zustande kommt spricht eher dafür, daß es sich um kleinmolekulare Substanzen handelt.

Wer an absoluten Zahlen bei der RNA-Bestimmung aus biologischem Material interessiert ist, wird diese Erscheinung genauer untersuchen müssen. In dieser Arbeit wurde die RNA bestimmt, um bei den verschiedenen Arten der Extraktion und bei den einzelnen Schritten eine Kontrolle zu haben, so daß ein bei allen Bestimmungen gleicher Fehler der RNA-Bestimmung ohne große Bedeutung ist.

412 Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Herzglykosiden und kardialer Ribonukleinsäure

Zur quantitativen Bestimmung der Bindung von Pharmaka an Protein oder RNA gibt es neben der Ultrazentrifugationsmethode die Gelfiltration und die Dialyse. Alle drei Methoden liefern die gleichen Ergebnisse (Scholtan, 1965; Krieglstein u. Kuschinsky, 1968). Für diese Arbeit bestand das Problem darin, daß für die Bindungsversuche

nur eine begrenzte Menge RNA zur Verfügung stand. Es kam daher darauf an, für den einzelnen Versuch eine möglichst geringe Menge RNA-Lösung einsetzen zu müssen. Dies gelang mit Ultrazentrifugenröhrchen, die 2 ml fassen, wozu für den Rotor (Fa. Beckman, Typ 65) Adapter erforderlich sind. Während für einen Versuch bei der Gelfiltration 20 ml bei der Dialyse mindestens 4 ml und bei der Ultrazentrifugation herkömmlicher Art 13,5 ml pro Zentrifugenröhrchen erforderlich sind.

Bei der Vorbereitung der Proben zur Messung der Aktivität zeigte sich, daß die Aufarbeitung (einfrieren, zersägen, auftauen) die Aktivität von ^3H -Digitoxin vermindert, während dies bei ^3H -Digoxin und ^3H -Ouabain nicht der Fall ist. Deswegen ist es notwendig bei dem Vergleich der RNA/Herzglykosid-Lösung vor und nach der Ultrazentrifugation die Ausgangslösung (100%) derselben Aufarbeitung zu unterziehen wie den zu messenden Überstand.

42 Diskussion der Ergebnisse

421 Die isolierte Ribonukleinsäure

Es wurden 23,5 mg RNA/100 g Herzmuskelgewebe gewonnen. Für die Isolierung von RNA aus kardialen Ribosomen liegt ein Vergleichswert vor. Earl und Korner (1965) gewannen aus Ribosomen des Rattenherzens 18 mg bzw. 23 mg (durch Behandlung des Gewebes mit Proteinase) RNA/100 g Herzmuskelgewebe. Nach diesen Autoren ist auch bekannt, daß

kardiale Ribosomen in der Hauptsache zwei Arten von RNA enthalten, die bei 19 S bzw. 28 S sedimentieren und im Verhältnis 1:2,4 vorliegen.

Die hier isolierte RNA wies diese Konstanten nicht auf. Die Schlierenzentrifugation ergab, daß relativ große Bruchstücke (Sedimentation bei 6,5 - 10,5 S) vorliegen, während die Dialyse zeigte, daß keine kleinen Bruchstücke (Molekulargewicht $< 20\,000$) vorhanden sind. Der für das Kalbsherz bestimmte Gehalt an RNA von 1,8 mg/g Feuchtgewicht liegt im Rahmen der von Nair et al. (1968) in einer Übersicht angegebenen Werte (0,7 - 4,1 mg/g Herzgewebe) für die Herzen anderer Säugetiere.

422 Die Bindung der Herzglykoside an kardiale Ribonukleinsäure

Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin werden an kardiale RNA nur in geringem Umfang gebunden. Die α -Werte betragen bei der Konzentration von 3×10^{-7} g/ml: für Digitoxin: 85,2%, für Digoxin: 91,5%, für g-Strophanthin: 92,2%. Eine Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration der Herzglykoside im geprüften Bereich liegt nicht vor. Zwar ist zwischen Digitoxin einerseits und Digoxin und g-Strophanthin andererseits statistisch kein Unterschied zu sichern, aber eine Tendenz zur stärkeren Bindung von Digitoxin ist erkennbar. Der Mangel an RNA verhinderte weitere diese Annahme sichernde Versuche. Dies

würde die Befunde über den hydrophoben Charakter der Bindung der Herzglykoside an Humanalbumin (Kuschinsky, 1970) und Hefe-RNA (Scholtan, 1968) unterstützen.

Da die Herzglykoside sehr stark an Humanalbumin gebunden werden (Scholtan, 1968; Kuschinsky, 197⁶⁹~~0~~) ist es wahrscheinlich, daß für die Anreicherung der Herzglykoside in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels die RNA ohne Bedeutung ist.

Während die digitalisähnlich wirkenden Bisguanylhydrazone sehr stark an RNA gebunden werden (Riechert u. Wollert, 1971) ist dies bei den Herzglykosiden kaum der Fall. Neben der unterschiedlichen Wirkung der Bisguanylhydrazone und der Herzglykoside auf die Na^+ und K^+ aktivierte Membran-ATPase des Herzmuskels (Dransfeld et al., 1967) ist dies ein weiterer Unterschied im Verhalten der Bisguanylhydrazone und Herzglykoside am Herzmuskel.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Herzglykoside werden in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels angereichert. Da diese Anreicherung in Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus stehen kann, war es interessant zu erfahren, an welchen Bestandteil der mikrosomalen Fraktion die Herzglykoside gebunden werden.

Bekannt ist, daß Herzglykoside stark an Protein (Humanalbumin) gebunden werden, und daß die digitalisähnlich wirkenden Bisguanylhydrazone ebenso stark an Ribonukleinsäure gebunden werden.

Diese Arbeit beschreibt eine Methodik zur Isolierung von Ribonukleinsäure aus dem Kalbsherzen. Dabei wurden 23,5 mg Ribonukleinsäure/100 g Herzmuskelgewebe (Feuchtwicht) gewonnen.

Anschließend wurde mittels Ultrazentrifugation die Bindung von Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin, die ^3H -markiert waren, an die kardiale Ribonukleinsäure untersucht. Die Ultrazentrifugations-Methode wurde so modifiziert, daß es möglich wurde, die Bindungsversuche mit sehr kleinen Volumina (2 ml) durchzuführen.

Es zeigte sich, daß die Herzglykoside in der angewandten Konzentration (3×10^{-7} g und 3×10^{-6} g/ml 0,5%ige RNA-Lösung) im Gegensatz zu digitalisartig wirkenden Bisguanylhydrazonen nur in sehr geringem Umfang

an Ribonukleinsäure gebunden werden. Die α -Werte betragen bei der Konzentration von 3×10^{-7} g/ml: für Digitoxin 85,2%; für Digoxin 91,5% und für g-Strophanthin 92,2%.

Für die Anreicherung der Herzglykoside in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels spielt die Ribonukleinsäure wahrscheinlich keine Rolle.

6. LITERATUR

ALLEN, R.J.L.:

The estimation of phosphorus.

Biochem. J. 34, 858-865 (1940)

BURTON, K.:

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamin reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 62, 315-323 (1956)

CHIPPERFIELD, D. and W.G. NAYLER:

The effect of ouabain on calcium in subcellular fractions of cardiac muscle.

J. Pharmacol. exp. Ther. 170, 311-317 (1969)

DRANSFELD, H., E. GALETKE und K. GREEFF:

Die Wirkung des Prednisolonbisguanylhydrazons auf die Na^+ und K^+ aktivierte Membran ATPase des Herz- und Skelettmuskels.

Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 166, 342-349 (1967)

DUTTA, S., S. GOSWAMI and B.H. MARKS:

The subcellular distribution of digoxin- H^3 in guinea pig and rat hearts.

Fed. Proc. 26, 398 (1967)

DUTTA, S., S. GOSWAMI, J.O. LINDOWER and B.H. MARKS:

Subcellular distribution of digoxin- H^3 in isolated guinea pig and rat hearts.

J. Pharmacol. exp. Ther. 159, 324-334 (1968)

EARL, D.C.N. and A. KORNER:

The isolation and properties of cardiac ribosomes and polysomes.

Biochem. J. 96, 721-734 (1965)

GERBER, H.-G., U. FRICKE, W. KLAUS und U. WOLLERT:
Über die intracelluläre Verteilung von ^3H -Digi-
toxin im Meerschweinchenherzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
260, 119 (1968)

HARRISON, C.E., JR., R.O. BRANDENBURG, P.A. ONGLEY,
A.L. DRVIS and C.A. OWEN, JR.:
The distribution and excretion of tritiated sub-
stances in experimental animals following the
administration of digoxin- ^3H .
J. Lab. clin. Med. 67, 764-777 (1966)

HOFMANN, P. und U. WOLLERT:
Die Verteilung des herzglykosidartig wirkenden
3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon
im Meerschweinchenorganismus.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1845-1849 (1969 a)

HOFMANN, P. und U. WOLLERT:
Die Verteilung des Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon
und des Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazon im Meer-
schweinchenorganismus.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
262, 484-494 (1969 b)

HOFMANN, P. und U. WOLLERT:
Über die subcelluläre Verteilung von 3,3'-Dimethyl-
4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon im Meer-
schweinchenherzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
263, 417-426 (1969 c)

I-SAN LIN, R. and U.A. SCHJEIDE:
Micro estimation of RNA by the cupric ion catalyzed
orcinol reaction.
Analyt. Biochem. 27, 473-483 (1969)

KEMP, J.W. and D.M. WOODBURY:

Subcellular distribution of 4-¹⁴C-diphenylhydantoin
in rat brain.

J. Pharmacol. exp. Ther. 177, 342-349 (1971)

KIRBY, K.S.:

Isolation and characterization of ribosomal ribo-
nucleic acid.

Biochem. J. 96, 266-269 (1965)

KOLLER, S.:

Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer
Zahlen.

4. Auflage, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1969

KRIEGLSTEIN, J. und G. KUSCHINSKY:

Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von
Pharmaka durch Gelfiltration.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 287-289 (1968)

KUSCHINSKY, K.:

Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen
für Herzglykoside.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.

262, 388-398 (1969)

KUSCHINSKY, K.:

The specificity of the binding of some cardenolides
to human serum albumin.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 842-844 (1970)

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL:

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MULÉ, S.J., C.M. REDMAN and J.W. FLESHER:

Intracellular disposition of H³-morphin in the brain
and liver of nontolerant and tolerant guinea pigs.

J. Pharmacol. exp. Ther. 157, 459-471 (1967)

MUNRO, H.N. and J.A.M. GRAY:

The nucleic acid content of skeletal muscle and liver in mammals of different body size.

Comp. Biochem. Physiol. 28, 897-905 (1969)

NAIR, K.G., A.F. CUTILLET, R. ZAK, T. KOIDE and M. RABINOWITZ:

Biochemical correlates of cardiac hypertrophie.

Circulat. Res. 23, 451-462 (1968)

PARISH, J.H. and K.S. KIRBY:

Reagents which reduce interactions between ribosomal RNA and rapidly labelled RNA from rat liver.

Biochim. biophys. Acta 129, 554-562 (1966)

REPKE, K.:

Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 233, 271-283 (1958)

RIECHERT, M. und U. WOLLERT:

Über die Wechselwirkung herzwirksamer Substanzen mit Ribonukleinsäure.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 268, 148-160 (1971)

SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

6. Mitteilung: Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrazentrifuge und mittels Gelfiltration.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 1433-1441 (1965)

SCHOLTAN, W., K. SCHLOSSMANN und H. ROSENKRANZ:

Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalis-Präparaten mittels der Ultrazentrifuge.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16, 109-118 (1966)

SCHOLTAN, W.:

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Human-
albumin und Ribonukleinsäure.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 505-517 (1968)

SNEDECOR, G.W.:

Statistical methods.

4. Auflage, Ames, Iowa 1950

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN:

Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments
Enolase.

Biochem. Z. 310, 384-421 (1941)

WOLLERT, U., P. HOFMANN, G. KUSCHINSKY und E. MUTSCHLER:

Über die intracelluläre Verteilung eines ali-
phatischen und aromatischen Bisguanylhydrazons
im Meerschweinchenherzen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
260, 220 (1968)

L e b e n s l a u f

Geboren wurde ich am 18.10.1942 in Berlin als drittes von vier Kindern. Mein Vater starb 1947; seit dieser Zeit arbeitet meine Mutter als Kindergartenleiterin.

Nach dem Krieg wohnten wir in Radeburg (Kr. Dresden), wo ich die Grundschule besuchte. Nach einem Jahr Oberschule flüchteten wir 1958 in die Bundesrepublik. Hier besuchte ich in Alzey das Aufbaugymnasium bis zum Abitur 1963.

Danach führte der Weg nach Tübingen (3 Semester Jurisprudenz), nach Innsbruck (ein Semester Philosophie, Theologie, Kunstgeschichte) und wieder zurück nach Tübingen, wo ich 1965 mit dem Medizinstudium begann. Nach dem Physikum (1967) kam ich nach Mainz, wo ich 1970 auch das Staatsexamen bestand.

Seit Januar 1971 arbeite ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

